



ラット大腸粘膜における線維芽細胞様細胞の部位差に関する研究

田村, 彩貴

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2024-03-05

(Date of Publication)

2026-03-05

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3441号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490197>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(別紙様式3)

論文内容の要旨

氏 名 田村 彩貴

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

ラット大腸粘膜における線維芽細胞様細胞の部位差に関する研究

動物の腸管粘膜固有層には、複数の種類の線維芽細胞様細胞 (FBLC) が存在し、腸管の恒常性維持に関わることが報告されている。腸管粘膜の組織学的特徴は、腸管の部位ごとに異なり、実際に免疫系細胞などを含め、様々な細胞の組織学的特徴に部位差が存在することが知られているが、FBLC 集団にどのような部位差が存在するかは明らかにされていない。そこで本博士論文では、ラット大腸粘膜における FBLC の部位差を明らかにするとともに、大腸粘膜における FBLC の部位差形成に常在細菌がもたらす影響についても明らかにすることを目的とした。

第 I 章では、ラットの大腸における各種 FBLC の部位差を明らかにすることを目的とし、大腸各部位 (盲腸, 上行結腸, 下行結腸) を用いて、FBLC に対する 3 つのマーカー (CD34, α SMA, PDGFR α) に対する免疫組織化学的解析を行い、FBLC の各種サブセットの量や局在の部位差を解析した。CD34 に対する免疫組織化学の結果、CD34 は血管内皮細胞および腸陰窩周囲の 2 つ以上の細胞突起を伸展させる FBLC で検出された。そこで、血管内皮細胞と FBLC を区別するため、CD34/CD31 (内皮細胞マーカー) の蛍光重染色を行ったところ、CD34⁺FBLC は盲腸では頻度は少ないものの、大腸全長で腸陰窩底部の粘膜固有層に認められた。また、CD34⁺FBLC は下行結腸で豊富に認められ、とくに腸陰窩底部で多いものの、他の部位と異なり腸陰窩側面でも認められた。次に、 α SMA に対する免疫組織化学を行った結果、大腸全長において、 α SMA は紡錘形の細胞や複数の細胞突起を伸ばした不定形の細胞で陽性を示した。 α SMA⁺細胞は大腸全長の腸陰窩底部から側面の粘膜固有層に局在し、上行結腸よりも盲腸および下行結腸でわずかに多く認められた。また、CD34/ α SMA の蛍光重染色より、 α SMA⁺細胞は大腸全長で CD34 陰性であった。さらに、PDGFR α に対する免疫組織化学を行った結果、PDGFR α は大腸全長において、腸陰窩底部から腸表面上皮の上皮直下の粘膜固有層に局在する FBLC で陽性を示した。PDGFR α /CD34 の蛍光重染色の結果、PDGFR α ⁺FBLC は大腸全長で CD34 陰性であった。一方、PDGFR α / α SMA の蛍光重染色の結果、大腸全長で殆どの PDGFR α ⁺FBLC は α SMA 陰性を示したが、上行結腸および下行結腸の腸陰窩周囲の PDGFR α ⁺FBLC の一部は α SMA 陽性を示した。また、 α SMA の陽性は上行結腸および下行結腸において腸陰窩底部の PDGFR α ⁺FBLC でより頻繁に認められたが、 α SMA⁺PDGFR α 細胞は大腸全長で腸陰窩周囲に均等に分布していた。さらに、腸陰窩周囲の PDGFR α ⁺FBLC の総数は、上行結腸よりも盲腸および下行結腸でわずかに多かつ

た。また、盲腸および上行結腸では PDGFR α ⁺FBLC は腸陰窩底部周囲には殆ど認められなかったが、下行結腸では PDGFR α ⁺FBLC の少数の細胞集団が認められた。以上の結果から、CD34⁺FBLC および PDGFR α ⁺FBLC の局在および頻度は大腸各部位で一定ではなく、とくに腸陰窩の底部側において部位ごとに特異的であることが明らかになった。この FBLC の部位ごとの違いは、大腸粘膜固有層内の微小環境の部位特異性に寄与している可能性が考えられた。

次いで第 II 章では、動物の組織構造を三次元解析できる SBF-SEM を用いて、盲腸と下行結腸における腸陰窩底部側周囲の FBLC 集団の超微形態を比較解析した。その結果、盲腸と下行結腸の両方の腸陰窩底部周囲には 2 つの細胞集団、「上皮下 FBLC」および「粘膜固有層 FBLC」が存在することが示された。上皮下 FBLC は上皮直下に局在し、第 I 章で認められた PDGFR α ⁺FBLC の局在と類似していた。一方、粘膜固有層 FBLC は上皮下 FBLC よりも上皮から離れた位置に局在しており、その局在は CD34⁺FBLC の局在と類似していた。上皮下 FBLC は、細胞体全体を上皮直下に配置しており、腸陰窩底部周囲に局在する FBLC の少数派の集団で、とくに盲腸では非常に稀であった。上皮下 FBLC のとくに上皮側には、細胞小器官を欠く高電子密度の細胞質領域が認められた。粘膜固有層 FBLC はいずれの部位においても、粘膜固有層内に網状構造を形成していた。一方、粘膜固有層 FBLC には、様々な三次元形態および局在性を示す FBLC が含まれていた。すなわち、一部の粘膜固有層 FBLC は上皮下 FBLC よりも離れているものの、腸陰窩の上皮に沿って局在していたのに対し、腸陰窩の間に局在するものも認められた。さらに、一部の粘膜固有層 FBLC が粘膜筋板に沿って認められた。腸陰窩底部周囲の粘膜固有層 FBLC の密度には、盲腸と下行結腸の間で差異は認められなかった。一方、盲腸では高度に拡張した小胞体を有する粘膜固有層 FBLC のみが存在したのに対し、下行結腸では低度の拡張を示す小胞体を有する粘膜固有層 FBLC が頻繁に認められた。さらに、粘膜固有層内では、免疫系細胞である顆粒球や形質細胞が粘膜固有層 FBLC に密接して存在していた。粘膜固有層 FBLC と隣接する好酸球数は、下行結腸よりも盲腸でより豊富であった。以上の結果から、上皮下 FBLC と粘膜固有層 FBLC の 2 種の FBLC が認められ、第 I 章における免疫組織化学の結果と合わせて FBLC の局在、存在量、超微形態の特徴は大腸の部位ごとに特異的であることが明らかになった。とくに、粘膜固有層 FBLC には免疫系の細胞が密接して存在しており、好酸球が下行結腸よりも盲腸に豊富に存在す

ることを考慮すると、盲腸の粘膜固有層 FBLC によって形成されるこのような網状構造は、好酸球などの免疫担当細胞が滞留しやすい足場である可能性が考えられた。

最後に第 III 章では、第 I 章および第 II 章で明らかになったラット大腸粘膜における FBLC の部位差について、腸内細菌叢が FBLC の部位差形成に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、抗生物質 (Abx 投与群) ないし溶媒の 1%スクロース溶液 (対照群) を飲水投与したラットの盲腸および下行結腸粘膜における FBLC の各種サブセットの量や局在を解析した。CD34 に対する免疫組織化学解析の結果、対照群および Abx 投与群の盲腸および下行結腸の粘膜固有層において、第 I 章の結果と同様に、CD34⁺FBLC が認められたが、その頻度は盲腸では極めて稀であった。また、下行結腸で認められた腸陰窩側面の CD34 陽性は Abx 投与群では対照群に比べて少なかった。血管内皮細胞マーカー CD31 と CD34 の蛍光重染色を行ったところ、CD34⁺CD31⁺FBLC は対照群/Abx 投与群とも盲腸では殆ど認められなかった。一方、下行結腸では対照群/Abx 投与群ともに腸陰窩底部から側面に CD34⁺CD31⁺FBLC が認められ、腸陰窩の底部より内腔側に配置する細胞は対照群で Abx 投与群と比較して多い傾向がみられた。一方、腸陰窩底部と粘膜筋板の間にも CD34⁺CD31⁺FBLC が認められたが、盲腸、下行結腸ともにその数には対照群と Abx 投与群間で差はみられなかった。さらに、PDGFR α に対する免疫組織化学を行った結果、第 I 章と同様、対照群/Abx 投与群の盲腸および下行結腸で腸陰窩底部から腸表面上皮の上皮直下に局在する FBLC が PDGFR α 陽性を示した。腸表面上皮側の PDGFR α ⁺FBLC 数には、盲腸および下行結腸ともに、対照群と Abx 投与群の間に有意な差は認められなかった。一方、下行結腸では、腸陰窩底部側で Abx 投与群の PDGFR α ⁺FBLC 数が対照群に比べて有意に少なかった。以上の結果から、CD34⁺FBLC および PDGFR α ⁺FBLC の部位差形成には、腸内細菌叢からの刺激が少なくとも部分的に貢献する可能性が考えられ、とくに下行結腸における FBLC が腸内細菌からの大きな影響を受けることが示された。

以上、本博士論文草稿では、免疫組織化学および超微形態学の観点から、ラットの大腸粘膜には部位ごとに特徴的な FBLC 集団が存在することを明らかにすることができた。とくに腸陰窩の底部側では、PDGFR α ⁺上皮下 FBLC と CD34⁺粘膜固有層 FBLC の量および局在が盲腸と下行結腸間で異なっており、これによって免疫系細胞を含む粘膜内の微小環境の部位差が形成されてい

(氏名：田村彩貴 No. 4)

る可能性が考えられた。また，腸内細菌がとくに下行結腸の $\text{PDGFR}\alpha^+\text{FBLC}$ と $\text{CD34}^+\text{FBLC}$ の数に影響を及ぼし，粘膜内の FBLC 集団の部位差形成に部分的に貢献する可能性も示すことができた。

氏名	田村 彩貴		
論文 題目	ラット大腸粘膜における線維芽細胞様細胞の部位差に関する研究		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	星 信彦
	副 査	教 授	本田 和久
	副 査	准教授	佐伯 圭一
	副 査	准教授	万谷 洋平
	副 査		
要 旨			
動物の腸管粘膜固有層には、複数種の線維芽細胞様細胞 (FBLC) が存在し、腸管の恒常性維持に関わることが報告されている。腸管粘膜の組織学的特徴は、部位ごとに異なり、実際に免疫系細胞などを含め、様々な細胞の組織学的特徴に部位差が存在することが知られているが、FBLC 集団にどのような部位差が存在するかは明らかにされていない。そこで、本学位論文草稿は、ラット大腸粘膜における FBLC の部位差を明らかにするとともに、大腸粘膜における FBLC の部位差形成に常在細菌がもたらす影響についても明らかにすることを目的とし、それらの成果をまとめたものである。 第 I 章では、ラットの大腸における各種 FBLC の部位差を明らかにすることを目的とし、大腸各部位 (盲腸、上行結腸、下行結腸) を用いて、FBLC に対する 3 つのマーカー (CD34, αSMA, PDGFRα) を用いた免疫組織化学的解析を行い、FBLC の各種サブセットの量や局在の部位差を解析している。CD34 に対する免疫組織化学の結果、CD34 は血管内皮細胞および腸陰窩周囲において 2 つ以上の細胞突起を伸展させる FBLC で陽性を示すことを見出している。さらに、血管内皮細胞と FBLC を区別するため、CD34/CD31 (内皮細胞マーカー) の蛍光重染色を行った結果、CD34⁺FBLC は盲腸では頻度は少ないものの、大腸全長で腸陰窩底部の粘膜固有層に存在することを認めている。また、CD34⁺FBLC は下行結腸で豊富に認められ、とくに腸陰窩底部で多いものの、他の部位と異なり腸陰窩側面でも認められることも明らかにしている。次に、αSMA に対する免疫組織化学を行った結果、大腸全長において、αSMA は紡錘形の細胞や複数の細胞突起を伸ばした不定形の細胞で陽性を示すことを明らかにしている。さらに、αSMA⁺細胞は大腸全長の腸陰窩底部から側面の粘膜固有層に局在し、上行結腸よりも盲腸および下行結腸でわずかに多く認められること、CD34/αSMA の蛍光重染色より、αSMA⁺細胞は大腸全長で CD34 陰性であることを見出している。さらに、PDGFRα に対する免疫組織化学を行った結果、PDGFRα は大腸全長において、腸陰窩底部から腸表面上皮の上皮直下の粘膜固有層に局在する FBLC で陽性を示し、PDGFRα/CD34 の蛍光重染色の結果、PDGFRα⁺FBLC は大腸全長で CD34 陰性であることを認めている。また、PDGFRα/αSMA の蛍光重染色の結果、大腸全長で殆どの PDGFRα⁺FBLC は αSMA 陰性を示したが、上行結腸および下行結腸の腸陰窩周囲の PDGFRα⁺FBLC の一部は αSMA 陽性を示すとの結果を得ている。αSMA の陽性は上行結腸および下行結腸において腸陰窩底部の PDGFRα⁺FBLC でより頻繁に認められるが、αSMA⁺PDGFRα 細胞は大腸全長で腸陰窩周囲に均等に分布することを見出している。さらに、腸陰窩周囲の PDGFRα⁺FBLC の総数は、上行結腸よりも盲腸および下行結腸でわずかに多いこと、盲腸および上行結腸では PDGFRα⁺FBLC は腸陰窩底部周囲には殆ど認められないが、下行結腸では PDGFRα⁺FBLC の少数の細胞集団が存在することを見出している。以上の結果から、CD34⁺FBLC および PDGFRα⁺FBLC の局在および頻度は大腸各部位で一定ではなく、とくに腸陰窩の底部側において部位ごとに特異的であることを結論づけている。さらに、この FBLC の部位ごとの違いが、大腸粘膜固有層内の微小環境の部位特異性に寄与している可能性を提唱している。 次いで第 II 章では、動物の組織構造を三次元解析できる SBF-SEM を用いて、盲腸と下行結腸における腸陰窩底部側周囲の FBLC 集団の超微形態を比較解析している。その結果、盲腸と下行結腸の両方の腸陰窩底部周囲には 2 つの細胞集団、「上皮下 FBLC」および「粘膜固有層 FBLC」が存在することを明らかにしている。上皮下 FBLC は上皮直下に局在し、第 I 章で認められた PDGFRα⁺FBLC の局在と類似する一方、粘膜固有層 FBLC は上皮下 FBLC よりも上皮から離れた位置に局在しており、その局在は CD34⁺FBLC の局在と類似するとの結果を得ている。上皮下 FBLC は、細胞体全体を上皮直下に配置しており、とくに			

氏 名	田村 彩貴
-----	-------

その細胞質の上皮側には、細胞小器官を欠く高電子密度の細胞質領域が存在することを認めている。一方、粘膜固有層 FBLC はいずれの部位においても、粘膜固有層内に網状構造を形成すること、粘膜固有層 FBLC には、様々な三次元形態および局在性を示す FBLC が含まれることを見出している。さらに、腸陰窩底部周囲の粘膜固有層 FBLC の密度には、盲腸と下行結腸の間で差異は認められなかった。一方、盲腸では高度に拡張した小胞体を有する粘膜固有層 FBLC のみが存在するのに対し、下行結腸では低度の拡張を示す小胞体を有する粘膜固有層 FBLC が頻繁に存在することを見出している。さらに、免疫系細胞である顆粒球や形質細胞が粘膜固有層 FBLC に密接して存在すること、粘膜固有層 FBLC と隣接する好酸球数は、下行結腸よりも盲腸でより豊富であることも明らかにしている。以上の結果から、上皮下 FBLC と粘膜固有層 FBLC の 2 種の FBLC が認められ、第 I 章における免疫組織化学の結果と合わせて、FBLC の局在、存在数、超微形態の特徴は大腸の部位ごとに特異的であることを結論づけている。とくに、粘膜固有層 FBLC には免疫系の細胞が密接して存在しており、好酸球が下行結腸よりも盲腸に豊富に存在することを考慮すると、盲腸の粘膜固有層 FBLC によって形成されるこのような網状構造は、好酸球などの免疫担当細胞が滞留しやすい足場である可能性を考察している。

最後に第 III 章では、第 I 章および第 II 章で明らかになったラット大腸粘膜における FBLC の部位差について、腸内細菌叢が FBLC の部位差形成に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、抗生物質 (Abx 投与群) ないし溶媒の 1%スクロース溶液 (対照群) を飲水投与したラットの盲腸および下行結腸粘膜における FBLC の各種サブセットの量や局在を解析している。CD34 に対する免疫組織化学解析の結果、対照群および Abx 投与群の盲腸および下行結腸の粘膜固有層において、第 I 章の結果と同様に、CD34⁺FBLC が認められたが、その頻度は盲腸では極めて稀であること、さらに下行結腸で認められた腸陰窩側面の CD34 陽性は Abx 投与群では対照群に比べて少ないことを見出している。血管内皮細胞マーカー CD31 と CD34 の蛍光重染色を行ったところ、下行結腸では対照群/Abx 投与群ともに腸陰窩底部から側面に CD34⁺CD31⁺FBLC が認められ、腸陰窩の底部より内腔側に配置する細胞は対照群で Abx 投与群と比較して多い傾向がみられることを明らかにしている。一方、腸陰窩底部と粘膜筋板の間にも CD34⁺CD31⁺FBLC が認められるが、盲腸、下行結腸ともにその数には対照群と Abx 投与群間で差はみられないとの結果が得られている。さらに、PDGFR α に対する免疫組織化学を行った結果、第 I 章と同様、対照群/Abx 投与群の盲腸および下行結腸で腸陰窩底部から腸表面上皮の上皮直下に局在する FBLC が PDGFR α 陽性を示し、下行結腸における腸陰窩底部側の PDGFR α ⁺FBLC 数は、Abx 投与群において、対照群に比べて有意に少ないことを見出している。以上の結果から、CD34⁺FBLC および PDGFR α ⁺FBLC の部位差形成には、腸内細菌叢からの刺激が少なくとも部分的に貢献する可能性が考えられ、とくに下行結腸における FBLC が腸内細菌からの大きな影響を受ける、と結論づけている。

以上、本学位論文草稿では、免疫組織化学および超微形態学の観点から、ラットの大腸粘膜には部位ごとに特徴的な FBLC 集団が存在することを明らかにしている。とくに腸陰窩の底部側では、PDGFR α ⁺上皮下 FBLC と CD34⁺粘膜固有層 FBLC の数および局在が盲腸と下行結腸間で異なっており、これによって免疫系細胞を含む粘膜内の微小環境の部位差が形成されている可能性を提唱している。また、腸内細菌がとくに下行結腸の PDGFR α ⁺FBLC と CD34⁺FBLC の数に影響を及ぼし、粘膜内の FBLC 集団の部位差形成に部分的に貢献する可能性を提唱している。

以上の成果は、ヒトを含めた哺乳動物の腸管における FBLC 集団の部位差に関して、多くの新たな基礎的知見を得たものとして、価値ある研究成果の集積であると認める。よって、学位申請者の田村彩貴氏は、博士 (農学) の学位を得る資格があると認める。